

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-313000

(43)公開日 平成6年(1994)11月8日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 K 15/14		8318-4H		
A 6 1 K 37/02	ABY	8314-4C		
C 1 2 N 5/10				
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		8412-4B	5/ 00	B
		審査請求 未請求 請求項の数18	FD (全 25 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-197752

(22)出願日 平成5年(1993)7月16日

(31)優先権主張番号 特願平4-212305

(32)優先日 平4(1992)7月17日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(31)優先権主張番号 特願平5-67339

(32)優先日 平5(1993)3月4日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 辻本 雅文

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

(72)発明者 栗原 達也

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

(72)発明者 石田 信宏

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

(74)代理人 弁理士 宇井 正一 (外4名)

最終頁に続く

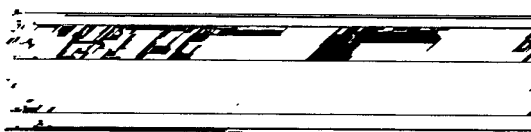
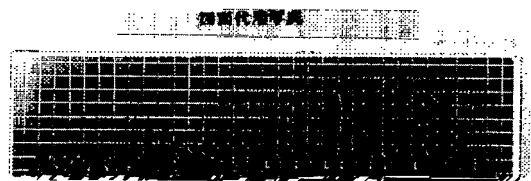
(54)【発明の名称】 巨核球増殖分化因子

(57)【要約】

【目的】 新規な巨核球増殖分化因子を提供する。

【構成】 下記性質：

- (1) 巨核球の増殖および成熟分化を促進する；
- (2) ゲル濾過及びSDS-PAGEの分析による分子量が55～57kDを示し、分子間ジスルフィド結合を待たない；
- (3) 等電点6.5±0.5を示す；及び
- (4) 配列番号1～9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つの配列を有する；を有する巨核球成熟分化因子、例えば、配列番号：30に示すアミノ酸配列を有する巨核球成熟分化因子及びその製造方法、並びにそれをコードする遺伝子、例えば配列番号：30に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記性質を有する巨核球増殖分化因子：

- (1) 巨核球の増殖および成熟分化を促進する；
- (2) ゲル濾過及びSDS-PAGEの分析による分子量が55～57kDを示し、分子間ジスルフィド結合を持たない；
- (3) 等電点6.5±0.5を示す；及び
- (4) 配列番号1～9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つの配列を有する。

【請求項2】 ヒト細胞によって生産される請求項1に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項3】 ヒト癌細胞により生産される請求項2に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項4】 ヒト類表皮癌細胞A431由来の細胞によって生産される請求項3に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項5】 無蛋白質培地で増殖させたヒト類表皮癌細胞A431由来の細胞によって産生される請求項4記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項6】 請求項1記載の巨核球増殖分化因子と同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1～複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、遺伝子組換え技術によって造成された形質転換細胞の培養物から得られる巨核球増殖分化因子。

【請求項7】 配列番号：30に示すアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列あるいは該アミノ酸配列または一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1～複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有する請求項6に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項8】 糖鎖が結合したものである請求項6または7記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項9】 N-末端が生化学的又は化学的に修飾されている、請求項6～8のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項10】 翻訳開始のメチオニンが除去され、それに続くアラニンがアセチル化されている、請求項9に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項11】 配列番号1～9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いて遺伝子組換え技術によって造成された形質転換細胞の培養物から得られる請求項6～10のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項12】 請求項1～11のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子のアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項13】 請求項12に記載の遺伝子を含んで成る発現ベクター。

【請求項14】 請求項13に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

【請求項15】 請求項1～11のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子を有効成分として含有する医薬組成物。

【請求項16】 血小板減少症治療薬である請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】 請求項1～11のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子を抗原とする抗体。

【請求項18】 請求項14に記載の宿主を培養又は飼育し、巨核球増殖分化因子を採取することを特徴とする、巨核球増殖分化因子の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、巨核球増殖分化因子及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに詳細には、巨核球-血小板系造血の促進因子として有用な巨核球増殖分化因子、その製造方法、及びその使用に関する。

## 【0002】

【従来の技術】各種血液細胞が、造血幹細胞から成熟血球に至る過程において、その増殖と分化を誘導する種々の造血因子が関与することは周知の事実である。血小板の寿命はヒトで9～10日と短い、血液中の血小板濃度は定常状態においてほぼ一定に保たれている。また実験動物において種々の方法で血小板を減少させても、数日のうちに血液中に血小板数の回復が認められている。これらのことから血小板減少期において血小板の産生を促進する因子が存在することが想定され、その因子を同定することに従来より多くの努力がはらわれてきた。

【0003】巨核球血小板系造血において血小板の前駆細胞である巨核球の形成には少なくとも2種類の調節因子が関与するものと考えられている。第1の因子は単独で巨核球コロニーを形成するもので巨核球コロニー刺激因子と呼ばれる。第2の因子は単独では巨核球コロニーを形成させる活性はないが、前者を共存させると巨核球のコロニー数を増やしたり、その増殖分化を促進する作用を有するもので巨核球増幅因子と呼ばれる。

【0004】前者に属するものとして、インターロイキン3、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子が、後者として、エリトロポエチン、マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン6、7及び11、LIFなどが知られている。またこれらの因子のなかには実際に *in vivo* において血小板数の増加や回復時期の短縮などの効果が認められているものもある（溝口秀昭：蛋白質核酸酵素 361195 '91）。

【0005】しかしこれらの因子の多くは巨核球/血小板系の増殖や分化のみではなく各系統の血球の分化にも関与するなど極めて多様な生物活性を示す。例えばIL-6およびIL-11には実際に *in vivo* における血小板の増多作用があるが急性期蛋白質の産生を促し

たり、著しい場合には悪液質をひきおこす。またIL-6の場合、腎臓のメサングウム細胞を増殖させ腎不全を起こす可能性があるなど臨床応用上の問題点も多い(松田正ら:蛋白質核酸酵素 36 1184 '91)。また血小板減少期においてIL-6は血中で高値を示さず生理的因子とは考えられていない。

【0006】血小板は、止血機構において重要な役割を果たしている。血小板減少を伴う疾患(Fanconi症候群、巨核球性血小板減少症、再生不良性貧血等)は臨床的には危険な疾患であり、特に出血した場合にはそれをコントロールできなくなるような状態になる。従って血小板の産生を促進する因子を単離同定することは、このような危険を回避するうえで有益であろうと考えられる。

【0007】また、骨髄移植は近年白血病等の有力な治療法になりつつあるがその成功率はEPO、G-CSF等のサイトカインの使用により上昇している。現在の問題点は血小板減少で、その増多因子が得られれば成功率はさらに上昇し、入院期間も短縮できると期待される。造血疾患に限らずがん化学療法や放射線療法時の血小板減少にも血小板増多因子でコントロールできよう。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記既知因子の持つ問題点に鑑み、血小板減少または血小板の機能低下を伴う疾患に有効な血小板の産生を促進する因子を見出すべく、鋭意研究を重ねた結果、巨核球の増殖および成熟分化を促進する新規因子を見出し、該因子をコードする遺伝子をクローニングし、さらに該遺伝子を有する発現ベクターを作製し、本発明の完成に至った。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、下記性質を有する巨核球増殖分化因子:

- (1) 巨核球の増殖および成熟分化を促進する;
- (2) ゲル濾過及びSDS-PAGEの分析による分子量が55~57kDを示し、分子間ジスルフィド結合を持たない;
- (3) 等電点6.5±0.5を示す;および
- (4) 配列番号1~9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つの配列を有する;に関する。

【0010】本発明の巨核球増殖分化因子の生成原料としては、ヒト細胞、例えばヒト癌細胞、好ましくはヒト類表皮癌細胞A431、特に好ましくは無蛋白質培地で増殖させた、ヒト類表皮癌細胞A431由来の細胞があげられる。また、本発明は、上記巨核球増殖分化因子と同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1~複数個のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有し、遺伝子組換え技術によって造成された形質転換細胞の培養物から得られる巨核球増殖分化因子にも関する。

【0011】さらに、配列番号:30に示すアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該アミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1~複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有する巨核球増殖分化因子に関する。本発明はさらに、前記巨核球増殖因子をコードする遺伝子に関する。本発明はさらに、該遺伝子を用いての、遺伝子組換え技術による巨核球増殖因子の製造方法にも関する。

10 【0012】遺伝子組換え技術は、上記巨核球増殖分化因子と同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1~複数個のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列をコードする合成または天然のポリヌクレオチドを用いて既知の手法に従って行えばよく、とくに限定されないが、シグナル配列の付加や改良、宿主ベクター系の好適選択、遺伝子の発現制御部位の改良等により発現効率の調節などを図ることができる。また、宿主の選択により糖鎖が結合されたものとして得てもよい。さらに、配列番号1~9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドを遺伝子クローニング用のDNAプローブとして用いてもよい。本発明はさらにまた、本巨核球増殖分化因子を有効成分として含有する医薬組成物を提供し、血小板減少症治療薬として好ましくは用いられる。また、本巨核球増殖分化因子を用いれば、公知の手法により、特異的抗体を得ることもできる。

#### 【0013】

#### 【具体的な説明】

##### (1) 材料

本発明の新規タンパク質の生成原料として、例えば、無タンパク質培地においてYamaguchiらの方法(Yamaguchi, Nら、Cancer Res. 50 7008 '91)により増殖可能となったヒト類表皮癌細胞A431(ATCC CRL 1555)由来の細胞の培養上清を用いる。本細胞はHuman epidermoid Carcinoma SBM330と命名されて、工業技術院微生物工学技術研究所に1992年7月1日付で微研条寄3911号(FERM BP-3911)として寄託されている。

##### 【0014】(2) 巨核球増殖分化因子の測定法

巨核球の増殖分化因子の測定には、巨核球系細胞株(例えばCMK細胞やそれ由来の細胞)、マウス骨髄細胞等を用いることができ、例えばマウス骨髄細胞を用いて、齧歯類の巨核球において特異的に検出されることが知られているアセチルコリンエステラーゼの活性測定をIshibashiらの方法(Ishibashi, T.ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 5953 '89)で行う。また巨核球の組織化学的

な検出は、骨髓細胞を培養後アセチルコリンエステラーゼ染色及びメイ＝グリュンワルド＝ギムザ染色を行い染色された細胞の形状を判定することにより行う。

【0015】(3) 巨核球増殖分化因子の精製

巨核球増殖分化因子の精製は、例えば、A431細胞の無タンパク質培養上清を出発材料とし、限外ろ過により濃縮後、カラムクロマトグラフィー、例えばMatrex Blue A (アミコン社)、Q-セファロース (ファルマシア社)、フェニルセファロース (ファルマシア社)、S-セファロース (ファルマシア社)、ハイロード26/60 スーパーデックス75 (ファルマシア社)、の各カラムクロマトグラフィーを順次組み合わせで行える。タンパク質はA<sub>280</sub> nmを測定することによりモニターする。

【0016】(4) 巨核球増殖分化因子の部分アミノ酸配列の決定：アミノ酸配列の構造を知るため、(3)で精製した巨核球増殖分化因子画分をプロテアーゼ (例えばアクロモバクターProtease I (API)) を加え37℃2時間処理してフラグメント化する。得られたペプチド断片をYMC-Pack AM-303カラムによる逆相HPLC (0.1% トリフルオロ酢酸存在下アセトニトリル勾配形成) により分取する。得られたペプチド断片をシーケンサー、例えばApplied Biosystem社製gas-phaseシーケンサーにかけアミノ酸配列を決定する。上記の巨核球増殖分化因子の具体的な精製方法、及び詳細な性質は実施例1に記載する。

【0017】本発明はまた、上記の巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子はmRNAからのcDNA、ゲノムDNA、化学合成DNAのいずれであってもよい。cDNAは、例えば、前記のようにしてヒト細胞、例えばヒト類表皮癌細胞、例えばA431細胞株から精製した巨核球増殖分化因子の、実施例1に示すような部分アミノ酸配列に基いて設計したDNA (ヌクレオチド) プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) によりクローニングすることができる。クローニングの具体的な1例を実施例2に示す。

【0018】本発明の遺伝子はさらに、巨核球増殖分化因子活性を有する蛋白または糖蛋白をコードし、配列番号：30のヌクレオチド配列とハイブリダイズするDNAも含まれる。実施例2においてクローニングされた、本発明の巨核球増殖因子をコードするDNAのヌクレオチド配列及び該ヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号：30に示す。

【0019】こうして、一旦アミノ酸配列が決定されれば、この天然アミノ酸配列に1～複数のアミノ酸が付加されておりなお巨核球増殖因子活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列から1～複数のアミノ酸が除去されておりなお巨核球増殖因子活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列中の1～複

数個のアミノ酸が他のアミノ酸により置き換えられておりなお巨核球増殖因子活性を維持しているポリペプチド、さらには、上記のアミノ酸付加変異、アミノ酸除去変異及びアミノ酸置換変異が組合わされた変異を有しなお巨核球増殖因子活性を維持しているポリペプチドなど、種々の変異型巨核球増殖因子を設計し、それを製造することができる。

【0020】上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の変異におけるアミノ酸の数は、特に限定されないが、付加については、例えば、本発明の巨核球増殖分化因子とのハイブリッド蛋白に用いられる機能性蛋白のアミノ酸の数 (例えば、マルトースバインディングプロテイン (maltose-binding protein) 等の公知の抽出精製もしくは安定化用蛋白または各種生理活性蛋白、例えばIL-3, IL-11のようなサイトカイン) や本因子に付加されたシグナルペプチドのそれに依存し、すなわち、当該変異の目的に依存して決定される。例えば、1～30、好ましくは、1～10の付加があげられる。

【0021】また、除去については、除去されるアミノ酸の数は、巨核球増殖活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～30、好ましくは1～20、また、本因子の活性領域以外の領域のアミノ酸の数があげられる。さらに、置換については、置換されるアミノ酸の数は、巨核球増殖活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～10、好ましくは、1～5があげられる。

【0022】本発明においては、巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子のヌクレオチド配列として配列番号：30に示すヌクレオチド配列を開示するが、本発明の巨核球増殖分化因子の遺伝子はこれに限定されない。一旦、天然巨核球増殖分化因子のアミノ酸配列が決定され、又は変異型巨核球増殖分化因子のアミノ酸配列が設計されれば、コドンの縮重に基き、同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を設計し、それを調製することができる。この場合、使用すべき宿主により高頻度で用いられるコドンを使用するのが好ましい。

【0023】本発明の天然巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子を得るには、実施例2に記載する様にしてcDNAを得ることができるが、これに限定されない。すなわち、天然巨核球増殖分化因子のアミノ酸配列をコードする1つのヌクレオチド配列が決定されれば天然巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子は、本発明に具体的に開示するストラテジーとは異なるストラテジーによりcDNAとしてクローニングすることができ、さらにはそれを生産する細胞のゲノムからクローニングすることもできる。

【0024】ゲノムからクローニングする場合、実施例2において使用した種々のプライマーヌクレオチド又はプローブヌクレオチドを、ゲノムDNA断片の選択のた

めプローブとして使用することができる。また、配列番号：30に記載するヌクレオチド配列に基いて設計された他のプローブを用いることもできる。ゲノムから目的とするDNAをクローニングするための一般的な方法は当業界においてよく知られている (Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、第5章及び第6章)。

【0025】本発明の天然巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子はまた、化学合成によっても調製することができる。DNAの化学合成は当業界において自動DNA合成機、例えばアプライドバイオシステム社396DNA/RNA合成機など採用して容易である。従って、当業者は、配列番号：30に示されるヌクレオチド配列のDNAを容易に合成することができる。

【0026】本発明の天然型巨核球増殖分化因子を生来のコドンとは異なるコドンによりコードする遺伝子、及び変異型巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子は、前記のごとく化学合成により調製することもでき、また配列番号：30又は図11～14に示すヌクレオチド配列を有するDNA又はRNAを鋳型として変異誘発プライマーと共に用いる部位特定変異誘発法 (site-directed mutagenesis) 等常法に従って得ることもできる (例えば、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、第8章を参照のこと)。

【0027】上記のようにして本発明の巨核球増殖分化因子の遺伝子が得られると、これを用いて、常用の遺伝子組換え法により組換え巨核球増殖分化因子を製造することができる。すなわち、本発明の巨核球増殖分化因子をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、そして得られた培養物 (細胞又は培地) から目的とする巨核球増殖分化因子を採取する。本発明の巨核球増殖分化因子は、生化学的又は化学的な修飾、例えば、N末端アシル化等されて得られてもよい。

【0028】また、配列番号：30のヌクレオチド配列に示される翻訳領域に基づき、蛋白質のデータベースをfastaプログラム (GCGパッケージ) によって検索を行ったところ、巨核球増殖分化因子は、セリンプロテアーゼ阻害因子のスーパーファミリーに属し、またこのファミリーに属し、N末端の長さ、予想立体構造、疎水性、親水性アミノ酸の分布が、本巨核球増殖分化因子と似ているヒト白血球エラスターゼ阻害因子、ニワトリオボアルブミンY遺伝子産物、ヒトプラスミノゲンアクチベーター阻害因子2、ヒトsquamous cell carcinoma抗原において、N末端が、切断除去を受けないシグナルペプチドを形成している。本巨核球増殖分化因子も、N末端がシグナルペプチドとしての機能を有し、かつ、切断されずにそのままの形で分泌されることもありうる。さらに、開始メチオニンの次

がアラニンであることより、一般に述べられているように本巨核球増殖因子は、開始メチオニンが脱離しアラニンがアセチル化されていてもよい。

【0029】宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、特に大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシルス属 (*Bacillus*) 細菌、例えばバシルス・ズブチリス (*B. subtilis*) 等を用いることができる。真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*)、等の真核性微生物、昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞 (*Spodoptera frugiperda*)、キャベツルーパー細胞 (*Trichoplusia ni*)、カイコ細胞 (*Bombyx mori*)、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等を使用することができる。本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーパー等を用いることもできる。

【0030】発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス (バキュロ (昆虫)、ワクチニア (動物細胞)) 等が使用できる。発現ベクター中のプロモーターは宿主細菌に依存して選択され、例えば細菌用プロモーターとしてはlacプロモーター、trpプロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、adh1プロモーター、pqkプロモーター等が使用される。また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルスポリヘドリンプロモーター等、動物細胞としてはSimian Virus 40のearlyまたはlateプロモーター等があげられる。

【0031】発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。培養物からの巨核球増殖分化因子の精製は、タンパク質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外濾過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。

#### 【0032】

【実施例】次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1. 巨核球増殖分化因子の単離精製

##### 1} A431細胞の培養

無タンパク質培地に馴化させたA431細胞由来の凍結保存株SBM330を解凍後、初期培地 (10%牛胎児血清を含むHam's F12培地) で培養した。

【0033】すなわち、150cm<sup>2</sup>の培養面積をもつTフラスコ10本に細胞をまき、細胞がコンフルエントに

なるまで37℃にて5%CO<sub>2</sub>の存在下で培養した。次に、0.25%トリプシン液(千葉血清)で細胞を剥離した後、850cm<sup>2</sup>の培養面積をもつローラーボトル10本に継代培養した。37℃、0.5rpmで約3日間培養した結果、1.8×10<sup>9</sup>細胞を回収した。回収した細胞を、Opti-cell培養器(チャールス・リバー Inc., Wilmington, MA)のセラミックコア(S-451)に付着せしめ、初期培地10Lで還流培養を開始した。

【0034】還流培養は、37℃で150mmHgの酸素を供給しながら行った。また、初期培地から無タンパク質培地への置換は次の様にして完結した。すなわち、初期培地で約7日間培養後、無タンパク質培地を20l/dayの割合で供給し、かつ、同割合で培養系から培養上清を回収した。この結果、約100Lの無タンパク質培地を供給することにより、血清を含む初期培地は、無タンパク質培地にはぼ置き換えられた。以後、細胞培養上清を連続的に回収することにより、1000Lの細胞培養上清を得た。得られた細胞培養上清の一部(約300L)を限外ろ過膜(ミリポア、Bedford, MA; MW 10,000カット)で2Lにまで濃縮し、20mMTris/HClバッファー(pH7.4)に対して充分透析したものを精製に供した。

【0035】2)マウス骨髓細胞による巨核球増殖分化因子の測定

雌性BDF<sub>1</sub>マウスの大腿骨から骨髓細胞を押し出しα-MEM培地(Flow Laboratories, Inc., McLean, VA, US)に懸濁した。密度の異なるパーコール(ファルマシアLKBバイオテクノロジー、東京)溶液を重層し骨髓細胞懸濁液をのせて400gで20分遠心した。d=1.07/1.08(g/ml)のインターフェイスに集まった単核球を10%FBSを含むα-MEMで一度洗った後、0.5mMジイソプロピルフルオロフォスフェートを含む同培地に再懸濁しプラスチックの細胞培養皿(Corning, Corning, NY, US)に入れ、37℃、5%二酸化炭素-95%空気の条件下で2時間培養した。途中1時間目に培養皿を新しいものに替えた。培養後細胞を10%FBS/α-MEMで3度洗った。

【0036】このようにして得た非付着性骨髓単核球細胞を10%FBS/1%BSA/0.1mM 2-メルカプトエタノール/α-MEMに懸濁し96穴マイクロプレート(Corning)中に一穴あたり5×10<sup>4</sup>細胞を播いた。必要に応じてテストサンプルに25U/mlマウス組み換え型IL-3(Genzyme Corporation, Cambridge, MA, US)、1~2μg/ml抗IL-6抗体(Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)を添加した。抗IL-6抗体を加える時は細胞をシードする前にテストサンプルと抗体を37℃で1時間前

培養した。

【0037】培養は5%CO<sub>2</sub>-5%O<sub>2</sub>-90%窒素存在下37℃で4~5日間行った。培養後マイクロプレートの各穴の細胞を2回PBSで洗った後180μlの0.2%(w/v)トリトンX-100, 1mMEDTA, 0.12M NaCl, 50mM HEPES, pH7.5で細胞をライシスさせ次に基質の5.6mMヨウ化アセチルチオコリンを20μl加えた。室温で1時間振とう培養した後各穴から20μlの液を蛍光測定用のマイクロプレート(Dynatech MicroFLUOR "B" Plate)に移した。

【0038】これに20μlの0.4mM 7-diet hylamino-3-(4'-maleimidyl phenyl)-4-methylcoumarin inアセトニトリル、160μlの0.2%(w/v)トリトンX-100, 1mMEDTA, 50mM Na acetate pH5.0を加えた後蛍光エミッションをフルオロメーターで読んだ(励起、365nm, エミッション450nm)。

【0039】染色用には細胞をサイトスピンで遠心しスライドグラスにはりつけた。アセチルコリンエステラーゼ染色は細胞を5%グルタルアルデヒド、10mMリン酸バッファー、pH6.7で15分固定後溝口の方法(血液幹細胞培養法、中外医学社(1986)三浦恭定編 p.82-88)に従ってアセチルチオコリンを基質として行った。

【0040】すなわち固定後スライドグラスを0.1Mリン酸バッファーpH6で洗浄し、次に各スライドグラスに1.5mlの0.67mg/mlヨウ化アセチルチオコリン、0.1Mリン酸バッファー(pH6.0)、0.2mlの30mM CuSO<sub>4</sub>、0.2mlの5mMフェリシアン化カリウム、0.1mlの0.1Mクエン酸ナトリウムの混合液をのせ、室温で4時間インキュベートした後、水洗いした。メイ=グリュンワルド=ギムザ染色は血液学で周知の方法でありE.メルク社(Darmsstadt, FRG)の各試薬を用いてメイ=グリュンワルド染色4分、ギムザ染色10分で行った。

【0041】3)巨核球増殖分化因子の精製

A431細胞培養上清濃縮液を透析後遠心し、その上清を20mM Tris/HClバッファー(pH7.4)で平衡化したMatrex Blue Aカラムにかけ、同一バッファーで充分洗浄後2M NaClを含む同バッファーで結合画分を溶出した。前記測定法により検出した巨核球増殖分化因子活性は結合画分に見出された。そこで同画分を20mM Tris/HClバッファー(pH7.4)で透析後同一バッファーで平衡化したQ-セファロースカラムにかけ、十分洗浄後NaClの勾配により巨核球増殖分化因子を溶出させた(図1参照)。同因子はNaCl0.3~0.5M付近に溶出された。

【0042】Q-セファロースで得られた活性画分に硫

安30%飽和相当分を加え、30%飽和硫安を含む20mM Tris/HCl バッファー (pH7.4) で平衡化したフェニルセファロースカラムにかけた。巨核球増殖分化因子は硫安(30%→0%)、エチレングルコール(0→50%)の濃度勾配を同時に形成させることにより溶出させた(図2参照)。抗IL-6抗体存在下で測定した巨核球増殖分化因子活性は濃度勾配形成の初期に広範囲にわたって認められた。

【0043】得られた画分は50mM MES/NaOHバッファー (pH6.0) に対して充分透析後、同一バッファーで平衡化したS-セファロースカラムにかけた。結合画分の溶出は0~0.5MのNaClにより濃度勾配を形成されることにより行った(図3参照)。活性は極めて広範囲に分布したが濃度勾配形成の初期に比較的強い活性が認められた。S-セファロースにより得られた画分を逐次ハイロード26/60スーパーデックス75(ファルマシア)カラムにかけゲルろ過を行った。カラムは予めPBSにより平衡化し、同バッファーにより溶出させた(図4参照)。巨核球増殖分化因子活性は分子量55~57kDa付近に溶出された。

【0044】以上の各ステップによりSDS-PAGE分析によっても55~57kDa付近に2本のバンドを示す画分がA431由来細胞培養上清3001より約80μg得られた。(図5参照)。この2本のバンドは活性の消長と良好な相関性(図1)を示した。従って本画分で観察された2本のバンドが求める巨核球増殖分化因子であると結論した。

【0045】4) 巨核球増殖分化因子の性質  
本発明における因子は下記の性質を有する。

1) 分子量: 約55kDa (ゲルろ過及びSDS-PAGE) (図4及び図5)

SDS-PAGEにおいては2本のバンドとして検出されるが、還元、非還元条件による移動度の差はない、従って分子間ジスルフィド結合を有さない。

2) 等電点: 6.5±0.5 (図6)

当該範囲に数本のバンドとして検出される。

【0046】3) 上記に示される本因子の不均一性は糖タンパク質の糖鎖構造の不均一性として説明可能である。すなわち本因子をアスパラギン結合糖鎖除去酵素であるエンドグリコシダーゼFで処理すると本因子のSDS-PAGE上での分子量が約40kDaに減少するとともに不均一性の低下が認められる(図7)。またSDS-PAGE上で単一バンドを示す画分と2本のバンドを示す画分をAPIにより消化し、逆相HPLCによる画分でペプチドマップを作製した場合においても両方で差が認められない。

4) 本因子は配列番号1~9に示されるアミノ酸配列の少なくとも1つを含有する。

【0047】5) 生物活性

精製された巨核球増殖分化因子およびIL-3の存在下

においてマウス骨髄細胞を培養すると巨核球数の増加及び成熟分化が観察される(図8、9及び10)。図8は培養後の巨核球アセチルコリンエステラーゼ活性を測定した結果であり、図9は培養後、細胞をアセチルコリンエステラーゼ染色した結果(×20)であり、そして図10は培養後、細胞をメイ=グリュンワルド=ギムザ染色した結果(×100)である。図9及び図10のいずれにおいても巨核球増殖分化因子の存在下(B)においてその非存在下(A)よりも巨核球が増加していることがわかる。

【0048】5) 巨核球増殖分化因子の構造

精製した本因子の構造を解析する目的で、本因子をAPI消化し、各ペプチド断片の構造決定を試みた。API消化後逆相HPLCにより各ペプチド断片を回収し、適当な画分について構造決定を行った結果、各ペプチド断片は配列表1~9に示すアミノ酸配列を有していた。

【0049】実施例2. 巨核球増殖分化因子cDNAの構造決定

1. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA塩基配列

の解析(1)

アミノ酸配列のうち配列番号: 3及び4より、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を推測しそれぞれオリゴマーNI065(配列番号: 10; 配列番号: 30の449~486に対応)及びNI067(配列番号: 11; 配列番号: 30の1049~1080に対応)を合成した。

【0050】A431細胞よりISOGEN(和光純薬)を用いて、添付の操作指示書にしたがって、全RNAを精製した。このRNAより、ポリAを有するRNAを精製し、3'-RACE Kit (Gibco BRL)を用い、反応を行った。上記のオリゴマーNI065と3'-RACE Kit (Gibco BRL)添付のオリゴマー3'-RACE アダプター・プライマー(配列番号: 12)を用いて添付の操作指示書にしたがってポリメラーゼチェーン反応(PCR)を行った。

【0051】この反応産物を用いさらにNI067と3'-RACE Kit (Gibco BRL)添付のオリゴマー3'-RACE アダプター・プライマーを用いて再びPCRを行うことによりおよそ900塩基対のDNA断片を得た。次いで、U.Gyllenstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652(1988)に基づき、PCR産物の直接塩基配列決定法を採用し、このおよそ900塩基対のDNA断片をそのまま反応基質として用い蛋白質を指示する部分とその下流の塩基配列を、アプライドバイオシステムズ社のTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencingキットと蛍光塩基配列決定装置(アプライドバイオシステムズ社370A型機)を採用し、添付の操作指示書にしたがって決定した。その結果、配列番号: 30のヌクレオチド番号1081より1950の配列が明らかに

なった。

【0052】この配列よりオリゴマーKY100（配列番号：13；配列番号：30の1255～1236の相補鎖に対応）を合成した。NI065と3'-RACE Kit（Gibco BRL）添付のオリゴマー3'-RACE アダプター・プライマーを用いてPCRを行った反応産物を反応基質として用いさらにNI065とKY100を用いてPCRを行い、807塩基対のDNA断片を得た。

【0053】この807塩基対のDNA断片をそのまま反応基質としてその塩基配列をアプライドバイオシステムズのTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencingキットと蛍光塩基配列決定装置を採用し、添付の操作指示書にしたがって決定した。その結果、配列番号：30のヌクレオチド番号487より1080の配列が明らかになった。この配列よりオリゴマーNI073（配列番号：14；配列番号：30の864～886に対応）、NI074（配列番号：15；配列番号：30の1012～992の相補鎖に対応）及びNI075（配列番号：16；配列番号：30の802～782の相補鎖に対応）を合成した。

#### 【0054】2. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA塩基配列の解析（2）

A. 巨核球増殖分化因子発現細胞株（A431）由来のmRNAの調製

ヒト類表皮癌細胞株（A431）の凍結細胞1.1gから、Pharmacia-LKB社のRNA抽出キット及びmRNA精製キットを用いて、25μgのmRNAを抽出・精製した。

【0055】B. 巨核球増殖分化因子発現細胞株（A431）由来のcDNAファージ・ライブラリーの調製

##### （1）cDNAの合成

A431由来のmRNA5μgから、Pharmacia-LKB社のTime Saver cDNA合成キットを用いて、cDNAを合成した。まず、ジエチルピロカーボネート（DEPC）処理蒸留水20μlに溶解したmRNA5μgを65℃にて10分間加熱した後、氷上で冷却した。ファースト・ストランド反応混合液11μl、DTT溶液1μl、Directional Cloning Tool box（Pharmacia-LKB社）添付の130 OD/ml Not I／オリゴマ（dT）18プライマー溶液（Pharmacia-LKB社）1μlを添加し、37℃にて1時間保温した。

【0056】反応物をセカンド・ストランド反応混合液に添加し、12℃にて30分間、22℃にて1時間保温した後、65℃にて10分間加熱した。100μlのフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（25：24：1、以下PCと略す）を加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて1分間遠心し、上清をセフ

アクリルS-400スピンカラム（Pharmacia-LKB社）を用いて分画し、100μlのcDNA溶液を得た。

【0057】（2）EcoRIアダプターの付加  
100μlのcDNA溶液に100D/ml EcoRIアダプター（Pharmacia-LKB社）5μl、ポリエチレングリコール緩衝液30μl、1/5希釈ATP溶液1μl及びT4DNAリガーゼ1μlを添加し、37℃にて1時間保温した。65℃にて10分間加熱した後、ATP溶液1.5μl及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ1μlを添加し、37℃にて30分間保温した。65℃にて10分間加熱した後、20U/μl Not I 2μlを添加し、37℃にて1時間保温した。150μlのPCを加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて1分間遠心し、上清をセフアクリルS-400スピンカラムを用いて分画し、150μlのcDNA溶液を得た。

【0058】（3）cDNAのファージベクターへの組み込みとin vitroパッケージング

15μlのcDNA溶液に、EcoRI及びNot Iで消化後、脱リン酸化処理したλgt11D（Pharmacia-LKB社）2μgを加え、エタノール沈殿後、8μlのリガーゼ緩衝液に溶解した。1/75希釈ATP溶液1μl、T4DNAリガーゼ1μlを添加し、16℃にて30分間保温した後、氷上で冷却保存した。

【0059】Giga Pack II Gold（Stratagene社）を用いて、in vitroパッケージング反応を行い、上記のリガーゼ反応産物3本から3.22×10<sup>6</sup> pfuの組換え体ファージを得た。大腸菌Y1090<sub>r</sub>を宿主として、上記ライブラリーを増幅し、6.0×10<sup>10</sup> pfu/mlのA431ファージ・ライブラリーストックを得た。

【0060】C. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA断片の単離同定

（1）PCRによるA431ファージ・ライブラリーcDNA挿入DNA断片の増幅

6.0×10<sup>10</sup> pfu/mlのA431ファージ・ライブラリーのストック溶液10μl（6.0×10<sup>8</sup> pfu相当）をPCR反応の鋳型DNAとして、10×PCR緩衝液5μl、1.25mM4dNTPs 8μl、1OD/ml λgt11-forwardプライマー（λgt11F）（配列番号：17）2μl、1OD/ml λgt11-reverseプライマー（λgt11R）（配列番号：18）2μl、及び5U/μl Taq DNAポリメラーゼ（Perkin Elmer Cetus社）1μlを添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて50μlとし、93℃にて1分間、55℃にて2分間、72℃にて3分間の反応サイクルを30回繰り返し、72℃にて10分間保温した。1%アガロースゲル電気泳動による解析の結果0.8～6kbに及ぶスメアーなパターンを示した。

【0061】（2）cDNA挿入DNA増幅断片混合物を鋳型としたTP7（配列番号：20；配列番号：30



の683~703に対応) / TP10、TP7/TP6 (配列番号: 19; 配列番号: 30の1036~1001の相補鎖に対応)、TP8 (配列番号: 21; 配列番号: 30の941~964に対応)、TP10 (配列番号: 22; 配列番号: 30の1036~986の相補鎖に対応) 及びTP8/TP6をプライマーとしたPCR解析

上記PCR反応産物1/5000希釈液1 $\mu$ lをPCR反応の鋳型DNAとして、10xPCR緩衝液5 $\mu$ l、1.25mM4dNTPs8 $\mu$ l、下記のような組み合わせの1OD/mlプライマー2 $\mu$ lづつ、及びPerfect Match (Stratagene社) 1 $\mu$ lを添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて49 $\mu$ lとした。

【0062】95℃にて5分間、60℃にて5分間加熱した後、5U/ $\mu$ l Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus社) 1 $\mu$ lを添加して、94℃にて1分間、60℃にて2分間、72℃にて3分間の反応サイクルを30回行い、72℃にて10分間保温した。プライマーとしては、TP7/TP10、TP7/TP6、TP8/TP10及びTP8/TP6を用いた。2%アガロースゲル電気泳動による解析の結果、プライマーに対応して、それぞれ354bp、354bp、96bp及び96bpのバンドを得た。

【0063】(3) TP7/TP10及びTP7/TP6をプライマーとしたPCR増幅産物 (354bp) の一次構造配列の解析

TP7/TP10及びTP7/TP6をプライマーする上記PCR増幅産物 (354bp) のバンドを電気泳動後の2%アガロースゲルから切り出し、DEPC処理蒸留水50 $\mu$ lを加えて45℃にて30分間加熱した。

【0064】このDNA溶液2 $\mu$ lをPCR反応の鋳型DNAとして、10xPCR緩衝液5 $\mu$ l、1.25mM4dNTPs8 $\mu$ l、下記のような組み合わせの1OD/mlプライマー2 $\mu$ lづつ、Perfect Match (Stratagene社) 1 $\mu$ lを添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて49 $\mu$ lとし、95℃にて5分間、60℃にて5分間加熱した後、5U/ $\mu$ l Taq DNAポリメラーゼ (PerkinElmer Cetus社) 1 $\mu$ lを添加して、94℃にて1分間、60℃にて2分間、72℃にて3分間の反応サイクルを30回行い、72℃にて10分間保温した。

【0065】プライマーとしては、TP7/TP10及びTP7/TP6を用いた。これらPCR反応産物 (それぞれ354bp) のバンドを電気泳動の2%アガロースゲルから切り出し、抽出・精製してpCRII (Invitrogen社) に挿入した後、大腸菌INV $\alpha$ F' (Invitrogen社) をトランスフォーメーションした。トランスフォーマントのプラスミドDNAを抽出精製し、EcoRI消化により354bpのDNA断片が挿入されていることを確認した。

【0066】挿入DNA断片の一次構造配列はM13 forwardプライマー (M13F) (配列番号: 23) 及びM13 reverseプライマー (M13R) (配列番号: 24) を用いて解析した (Applied Biosystems社の自動シーケンサー、モデル370A)。

【0067】その結果、配列番号: 30のヌクレオチド番号704~999に相当する296bpの配列が明らかとなり、この中には、プライマーTP7の下流に相当するアミノ酸配列番号9のC末端3アミノ酸 (XRK, DNA塩基配列からはERK)、プライマーTP6の上流に相当するアミノ酸配列番号6のN末端5アミノ酸 (ADLSG)、及びプライマーTP8に相当するアミノ酸配列番号5の8アミノ酸 (YLRALGLK) に対応する配列が存在し、このPCR反応産物 (それぞれ354bp) が巨核球増殖分化因子cDNAの一部であることが明らかとなった。

### 【0068】3. 巨核球増殖分化因子cDNAのスクリーニング

A. 巨核球増殖分化因子発現細胞株 (A431) 由来のcDNAプラスミド・ライブラリーの調製

(1) ファースト・ストランドcDNAの合成

A431由来のmRNA5 $\mu$ gから、Gibco BRL社のSuperScriptプラスミドシステムを用いて、cDNAを合成した。

【0069】まず、2 $\mu$ lのNotIプライマー・アダプターを、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理蒸留水5 $\mu$ lに溶解したmRNA5 $\mu$ gに加え、70℃にて10分間加熱した後、氷上で冷却した。5xファースト・ストランド緩衝液4 $\mu$ l、0.1MDTT溶液2 $\mu$ l、10mM4dNTPs1 $\mu$ l及びDEPC処理蒸留水1 $\mu$ lを添加し、37℃にて2分間保温した。5 $\mu$ lのSuperScript逆転写酵素を加え、37℃にて1時間保温した後、氷上に置き反応を停止した。

【0070】(2) セカンド・ストランドcDNAの合成

ファースト・ストランドcDNAの合成に用いた20 $\mu$ lの反応液のうちの18 $\mu$ lに、DEPC処理蒸留水93 $\mu$ l、5xセカンド・ストランド緩衝液30 $\mu$ l、10mM4dNTPs3 $\mu$ l、10U/ $\mu$ l E. coli DNAリガーゼ1 $\mu$ l、10U/ $\mu$ l E. coli DNAポリメラーゼ4 $\mu$ l、及び2U/ $\mu$ l E. coli RNaseH1 $\mu$ lを添加し、16℃にて2時間保温した。2 $\mu$ l (10U) のT4DNAポリメラーゼを添加し、16℃にて5分間保温した。

【0071】反応液を氷上に置き10 $\mu$ l0.5M EDTA及び150 $\mu$ lのPCを加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて10分間遠心し、上清140 $\mu$ lを新たな遠心チューブに移した。7.5M酢酸アンモニウム70 $\mu$ l及びエタノール0.5mlを加えて攪拌し、-80℃にて30分間放置した。14,000xgに

て10分間遠心し、上清を除いた後、0.5mlの70%エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥した。

【0072】(3) BstX Iアダプターの付加  
上記のcDNA沈殿を25μlのDEPC処理蒸留水に溶解し、5xT4DNAリガーゼ緩衝液10μl、BstX Iアダプター (Invitrogen社) 10μl及びT4DNAリガーゼ5μlを添加し、16℃にて16時間保温した。50μlのPCを加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて5分間遠心し、上清45μlを新たな遠心チューブに移した。7.5M酢酸アンモニウム25μl及びエタノール150μlを加えて攪拌し、-80℃にて30分間放置した。14,000xgにて10分間遠心し、上清を除いた後、0.5mlの70%エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥した。

【0073】(4) Not I消化  
上記のcDNA沈殿を41μlのDEPC処理蒸留水に溶解し、REAct7緩衝液5μl、Not I 4μlを添加し、37℃にて2時間保温した。50μlのPCを加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて10分間遠心し、上清45μlを新たな遠心チューブに移した。

(5) アダプターの除去と部分的cDNAのサイズ分画  
上記のcDNA溶液をQuick Spin Column Linker 5 (Boehringer Mannheim 社)を用いて分画した。40μg/μlのcDNAが50μl得られた。

【0074】(6) cDNAのファージベクターへの組み込みと大腸菌のトランスフォーメーション

上記のcDNA溶液37.5μlに、Not I及びBstX I消化したpRC/CMV (Invitrogen社)ベクター(29μg/μl)を12.5μl加え、Takara LigationキットA液400μl及びB液50μlを添加し、16℃にて30分間保温した。Max Efficiency DH5αコンピテントセル (Gibco BRL 社) 1mlを用いてトランスフォーメーションを行い、71,550クローンの組換え体を得た。プレートから全コロニーを集菌し(2.86×10<sup>7</sup>細胞/ml)、20%グリセロール存在下で-80℃にて保存した。

【0075】B. コロニー・ハイブリダイゼーションによる巨核球増殖分化因子cDNAのスクリーニング

A431由来のcDNAプラスミド・ライブラリーを用いて、9cmプレート60枚に合計22.7万個(プレート当たり3700個)のコロニーをニトロセルロースフィルターに写し取った。プローブは、NI067と3'-RACE adaptor (Gibco BRL 社)をプライマーとする900bpのPCR産物(前述)のBamHI消化による2つのDNA断片(0.5kb及び0.4kb)を[α-<sup>32</sup>P]dCTPを用いたニックトランスレーションにより調製した。

【0076】コロニー・ハイブリダイゼーションにおい

ては、フィルターを5xSSC、25mMリン酸緩衝液(pH7.4)、5xDenhardt Solution、1%SDS、100μg/ml熱変性鮭精子DNA及び50%ホルムアミド中で42℃にて18時間保湿し、5xSSC、0.1%SDS中で40℃にて20分間、45℃にて20分間洗浄した。検出はBAS2000 (Fujiフィルム)を用いて18時間露光にて行った。

【0077】三次スクリーニングまで行い、TP290、TP308、TP310、及びTP317の4種のクローンを得た。挿入cDNAの長さは、それぞれ1.2kb、1.1kb、1.2kb及び1.2kbであった。TP290、TP310、及びTP317は配列番号:30のヌクレオチド番号685より下流の領域をカバーすることが明らかとなった。

【0078】4. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA塩基配列の解析(3)

A. 巨核球増殖分化因子発現細胞株(HPC-Y11)由来)のmRNAの調製

ヒト脾臓癌細胞株(HPC-Y11)の凍結細胞1.1gから、Pharmacia-LKB社のRNA抽出キット及びmRNA精製キットを用いて、50μgのmRNAを抽出・精製した。

【0079】B. 巨核球増殖分化因子発現細胞株(HPC-Y11)由来のcDNAファージ・ライブラリーの調製

(1) cDNAの合成

HPC-Y11由来のmRNA 5μgから、Pharmacia-LKB社のTime Saver cDNA合成キットを用いて、cDNAを合成した。まず、ジエチルピロカーボネート(DEPC)処理蒸留水20μlに溶解したmRNA 5μgを65℃にて10分間加熱した後、氷上で冷却した。ファースト・ストランド反応混合液11μl、DTT溶液1μl、Directional Cloning Tool box (Pharmacia LKB 社)添付のNot I/オリゴマ(dT)18プライマー溶液1μlを添加し、37℃にて1時間保温した。

【0080】セカンド・ストランド反応混合液100μlを添加し、12℃にて30分間、22℃にて1時間保温した後、65℃にて10分間加熱した。100μlのフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1、以下PCと略す)を加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて1分間遠心し、上清をセファクリルS-400スピカラム(Pharmacia-LKB 社)を用いて分画し、100μlのcDNA溶液を得た。

【0081】(2) EcoRIアダプターの付加  
100μlのcDNA溶液にEcoRIアダプター(Pharmacia-LKB 社)5μl、ポリエチレングリコール30μl、ATP溶液1μl及びT4DNAリガーゼ1μlを添加し、37℃にて1時間保温した。65℃にて10分間加熱した後、ATP溶液1.5μl、T4ポリヌク

レオチドキナーゼ  $1 \mu\text{l}$  を添加し、 $37^\circ\text{C}$  にて30分間保温した。 $65^\circ\text{C}$  にて10分間加熱した後、 $\text{Not I}$   $2 \mu\text{l}$  を添加し、 $37^\circ\text{C}$  にて1時間保温した。 $150 \mu\text{l}$  のPCを加えて、激しく攪拌した後、 $14,000 \times \text{g}$  にて1分間遠心し、上清をセファクリルS-400スピナラムを用いて分画し、 $150 \mu\text{l}$  のcDNA溶液を得た。

【0082】 (3) cDNAのファージベクターへの組み込みと *in vitro* パッケージング

$15 \mu\text{l}$  のcDNA溶液に、 $\text{EcoRI}$  及び  $\text{Not I}$  で消化後、脱リン酸化処理した  $\lambda \text{gt}11\text{D}$  (Pharmacia-LKB 社)  $2 \mu\text{g}$  を加え、エタノール沈殿後、 $8 \mu\text{l}$  のリガーゼ緩衝液に溶解した。 $1/75$  希釈ATP溶液  $1 \mu\text{l}$ 、T4DNAリガーゼ  $1 \mu\text{l}$  を添加し、 $16^\circ\text{C}$  にて30分間保温した後、氷上で冷却保存した。 $\text{GigaPack II Gold}$  (Stratagene社) を用いて、*in vitro* パッケージング反応を行い、上記のリガーゼ反応産物3本から5、 $3.4 \times 10^6$  pfu の組換え体ファージを得た。大腸菌Y1090<sub>r</sub> を宿主として、上記ライブラリーを増幅し、 $1.7 \times 10^{11}$  pfu/ml のHPC-Y11ファージ・ライブラリストックを得た。

【0083】 C. PCRによる巨核球増殖分化因子全長cDNA 5' 側断片の単離同定

(1) PCRによるHPC-Y11ファージ・ライブラリーcDNA挿入DNA断片プライマーNI074上流領域部分の増幅

$1.7 \times 10^{11}$  pfu/ml のHPC-Y11ファージ・ライブラリストック溶液  $1 \mu\text{l}$  ( $1.7 \times 10^8$  pfu相当) をPCR反応の鋳型DNAとして、 $10 \times \text{PCR}$  緩衝液  $5 \mu\text{l}$ 、 $1.25 \text{ mM}$   $4 \text{ dNTPs}$   $8 \mu\text{l}$ 、 $100 \text{ D/ml}$   $\lambda \text{gt}11\text{-forward F1}$  プライマー (配列番号: 25)  $1 \mu\text{l}$ 、 $50 \text{ D/ml}$  NI074プライマー  $1 \mu\text{l}$  及び  $\text{Perfect Match}$  (Stratagene社)  $1 \mu\text{l}$  を添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて  $49 \mu\text{l}$  とした。

【0084】  $95^\circ\text{C}$  にて5分間、 $60^\circ\text{C}$  にて5分間加熱した後、 $5 \text{ U}/\mu\text{l}$  TaqDNAポリメラーゼ (Perkin ElmerCetus 社)  $1 \mu\text{l}$  を添加して、 $94^\circ\text{C}$  にて1分間、 $60^\circ\text{C}$  にて1分間、 $72^\circ\text{C}$  にて2分間の反応サイクルを35回行い、 $72^\circ\text{C}$  にて10分間保温した。2%アガロースゲル電気泳動による解析の結果0.3~6kbに及ぶスミアなパターンを示した。

【0085】 (2)  $\lambda \text{gt}11\text{F1}/\text{NI074}$  をプライマーとしたPCR増幅断片混合物を鋳型とした  $\lambda \text{gt}11\text{F2}$  (配列番号: 26) /NI075,  $\lambda \text{gt}11\text{F2}/\text{TP12}$  (配列番号: 28; 配列番号: 30の703~683の相補鎖に対応),  $\lambda \text{gt}11\text{F2}/\text{TP11}$  (配列番号: 27; 配列番号: 30の619~599の相補鎖に対応),  $\lambda \text{gt}11\text{F2}/\text{TP13}$  (配列番号: 29; 配列番号: 30の595~575の相補鎖

に対応), TP7/NI074, TP7/NI075及びNI073/NI074をプライマーとしたPCR解析

【0086】 上記PCR反応産物  $1/100$  希釈液  $1 \mu\text{l}$  をPCR反応の鋳型DNAとして、 $10 \times \text{PCR}$  緩衝液  $5 \mu\text{l}$ 、 $1.25 \text{ mM}$   $4 \text{ dNTPs}$   $8 \mu\text{l}$ 、下記のような組み合わせの  $100 \text{ D/ml}$  プライマー  $0.5 \mu\text{l}$  づつ、及び  $\text{Perfect Match}$  (Stratagen 社)  $1 \mu\text{l}$  を添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて  $49 \mu\text{l}$  とし、 $95^\circ\text{C}$  にて5分間、 $60^\circ\text{C}$  にて5分間加熱した後、 $5 \text{ U}/\mu\text{l}$  TaqDNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus社)  $1 \mu\text{l}$  を添加して、 $94^\circ\text{C}$  にて1分間、 $60^\circ\text{C}$  にて2分間、 $72^\circ\text{C}$  にて2分間の反応サイクルを35回行い、 $72^\circ\text{C}$  にて10分間保温した。

【0087】 プライマーとしては、 $\lambda \text{gt}11\text{F2}/\text{NI075}$ ,  $\lambda \text{gt}11\text{F2}/\text{TP12}$ ,  $\lambda \text{gt}11\text{F2}/\text{TP11}$ ,  $\lambda \text{gt}11\text{F2}/\text{TP13}$ , TP7/NI074, TP7/NI075、及びNI073/NI074を用いた。2%アガロースゲル電気泳動による解析の結果、プライマーに対応して、それぞれ969bp, 870bp, 786bp, 762bp, 330bp, 120bp、及び149bpのバンドを得た。

【0088】 (3) F2/NI075をプライマーとしたPCR増幅産物 (969bp) の  $\lambda \text{gt}11\text{F}/\text{TP11}$  及び  $\lambda \text{gt}11\text{F}/\text{TP13}$  をプライマーとしたPCR解析とその一次構造配列の解析

$\lambda \text{gt}11\text{F2}/\text{NI075}$  をプライマーとする上記PCR反応産物 (969bp) の  $0.5 \mu\text{l}$  をPCR反応の鋳型DNAとして、 $10 \times \text{PCR}$  緩衝液  $5 \mu\text{l}$ 、 $1.25 \text{ mM}$   $4 \text{ dNTPs}$   $8 \mu\text{l}$ 、 $100 \text{ D/ml}$   $\lambda \text{gt}11\text{F}$  プライマー  $1 \mu\text{l}$ 、 $100 \text{ D/ml}$  TP11プライマー  $1 \mu\text{l}$  又は  $100 \text{ D/ml}$  TP13プライマー  $1 \mu\text{l}$ 、及び  $\text{Perfect Match}$  (Stratagen 社)  $1 \mu\text{l}$  を添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて  $49 \mu\text{l}$  とした。

【0089】  $95^\circ\text{C}$  にて5分間、 $60^\circ\text{C}$  にて5分間加熱した後、 $5 \text{ U}/\mu\text{l}$  TaqDNAポリメラーゼ (Perkin ElmerCetus 社)  $1 \mu\text{l}$  を添加して、 $94^\circ\text{C}$  にて1分間、 $60^\circ\text{C}$  にて2分間、 $72^\circ\text{C}$  にて2分間の反応サイクルを35回行い、 $72^\circ\text{C}$  にて10分間保温した。

【0090】 PCR反応産物 (それぞれ678bp, 654bp) のバンドを電気泳動後の2%アガロースゲルから切り出し、抽出・精製してpCRII (Invitrogen社) に挿入した後、大腸菌INV $\alpha$ F' (Invitrogen社) をトランスフォーメーションした。トランスフォーマントのプラスミドDNAを抽出精製し、 $\text{EcoRI}$  消化により0.7kbのDNA断片が挿入されていることを確認した。挿入DNA断片の一次構造配列はM13forwardプライマーM13F及びM13reverseプライマーM13Rを用いて解析した (Applied Biosystems社

の自動シーケンサー、モデル370A)。

【0091】その結果、配列番号：30のヌクレオチド番号1～619に相当する619bpの配列が明らかとなり、配列番号：30のヌクレオチド番号487から619までの133ヌクレオチドの配列は、実施例2.1で明らかになった一次構造配列のN末端側に一致した。この619bpの配列の中には、アミノ酸配列番号：3の19アミノ酸 (DNA塩基配列からはVERVDFTNHLEDTRRNINK)、アミノ酸配列番号：7の5アミノ酸 (LYDAK) に対応する配列が存在し、このPCR反応産物 (それぞれ0.7kb) が巨核球増殖分化因子cDNAの一部であることが明らかとなった。

【0092】翻訳開始メチオニンはヌクレオチド74番目と考えられ、5' 非翻訳領域は73bpであった。従って、このPCR反応産物 (それぞれ0.7kb) が巨核球増殖分化因子の構造遺伝子のN末端を含むことが明らかとなった。

#### 【0093】5. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA塩基配列の解析 (4)

本項4. C (3) より得られたHPC-Y11由来巨核球増殖分化因子の構造遺伝子のN末端及び、5' 非翻訳領域と考えられる配列のうち5' 非翻訳領域と考えられる部分の配列である配列番号：30のヌクレオチド番号12～31の配列よりオリゴマーNIO83 (配列番号：31) を合成した。

【0094】本項1. で調製したA431細胞のポリAを有するRNAを用い、Pre amplification System (Gibco BRL) を用い、添付のオリゴマーであるランダム・ヘキサマーを用い添付の操作指示書にしたがってfirst strand cDNAを合成し、NIO83とNIO74を用いAmpli Taq (宝酒造) にてPCRを行った。その結果、巨核球増殖分化因子cDNA断片である1001塩基対のDNA断片を得た。

【0095】この1001塩基対のPCR産物であるDNA断片をそのまま反応基質として用い、Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing キット (アプライドバイオシステムズ社) と蛍光塩基配列決定装置 (アプライドバイオシステムズ社370A型機) を採用し、添付の操作指示書にしたがって本項1と同様、直鎖塩基配列決定法により塩基配列を決定した。その結果、配列番号：30のヌクレオチド番号32より486の配列を明らかにした。また、配列番号：30のヌクレオチド番号487より991の配列について得られた結果は、本項1. で得られた配列と一致した。

【0096】本項1. で得られた配列と合わせA431細胞の巨核球増殖分化因子cDNAの塩基配列である配列番号：30のヌクレオチド番号32より1950の配列が明らかになった。この配列について、アミノ酸翻訳への全ての場合である3つの読み枠について機械的にア

ミノ酸配列に翻訳を行った。その内のひとつの読み枠の中に、配列番号：1～9のアミノ酸配列全てが存在する連続してアミノ酸配列に翻訳が可能な領域を持つものを見だし、巨核球増殖分化因子の読み枠を明らかにした。

【0097】この読み枠で、翻訳開始部位に見いだされるメチオニンのコード (配列番号：30のヌクレオチド番号74より76) が存在し、ここより配列番号：1～9のアミノ酸配列が存在する連続してアミノ酸配列に翻訳が可能な領域が配列番号：30のヌクレオチド番号1213まで続くことを見だし、配列番号：30のヌクレオチド番号74より1213までが、巨核球増殖分化因子に翻訳される部分であることを明らかにした。

【0098】配列番号：30のヌクレオチド番号74より76のメチオニンのコードは、M. Kozakによって見いだされた翻訳開始部位に高頻度に見いだされるメチオニンのコードと周辺の配列 (6' NNATGG) (Nucleic Acids Research (1981) Vol. 9 P. 5233-5252) にたいしGCAATGG (配列番号：30のヌクレオチド番号71より77) と適合した。

【0099】巨核球増殖分化因子の一次構造配列が明らかになり、構造遺伝子のアミノ酸残基数は380、推定分子量は42904.43、推定等電点が6.79であった。アミノ酸配列配列番号：1が、配列番号：30のアミノ酸番号188より196に、アミノ酸配列配列番号：2が、配列番号：30のアミノ酸番号181より187に、アミノ酸配列配列番号：3が、配列番号：30のアミノ酸番号126より144に、アミノ酸配列配列番号：4が、配列番号：30のアミノ酸番号325より341に、

【0100】アミノ酸配列配列番号：5が、配列番号：30のアミノ酸番号289より297に、アミノ酸配列配列番号：6が、配列番号：30のアミノ酸番号305より324に、アミノ酸配列配列番号：7が、配列番号：30のアミノ酸番号121より125に、アミノ酸配列配列番号：8が、配列番号：30のアミノ酸番号284より288に、アミノ酸配列配列番号：9が、配列番号：30のアミノ酸番号204より213に対応していた。さらに、ポリA付加シグナルであるAATAAA配列が、配列番号：30のヌクレオチド番号1933より1938に存在した。

#### 【0101】実施例3. A431細胞からのPCRによる巨核球増殖因子cDNAの単離同定と発現ベクターの作製

実施例2によって得られた配列 (配列番号：30) よりオリゴマーNIO78 (配列番号：32) とNIO79 (配列番号：33) を合成した。なお、NIO78では、翻訳開始メチオニンコードを含むヌクレオチド番号13から37が、配列番号：30のヌクレオチド番号74より98の配列と一致し、人工的に、EcoRI認識

部位（ヌクレオチド番号4から9）とNr u I認識部位（ヌクレオチド番号8から13）を付加してあり、そしてNI 079では、ヌクレオチド番号17から49が、配列番号：30のヌクレオチド番号1237より1269の相補鎖の配列と一致し、人工的に、E c o R I認識部位（ヌクレオチド番号3から8）とNo t I認識部位（ヌクレオチド番号9から16）を付加してある。

【0102】実施例3の項1.で調製したA431細胞のポリAを有するRNAを用い、P r e a m p l i f i c a t i o n S y s t e m (G i b c o B R L)を用い、添付のオリゴマーであるランダムヘキサマーを用い添付の操作指示書にしたがって第一鎖cDNAを合成し、NI 078とNI 079を用いA m p l i T a q (Perkin Elmer Cetus社)にてPCRを行った。その結果、巨核球増殖分化因子cDNA断片であり巨核球増殖分化因子蛋白質の情報の全てを有する、1224塩基対のDNA断片を得た。

【0103】このDNA断片をE c o R Iで処理し、オリゴマーNI 078（配列番号：32）とNI 079

（配列番号：33）に人工的に付加してあるE c o R I認識部位を利用し、巨核球増殖分化因子cDNA断片の両端にE c o R I接着部位を生じさせた。この巨核球増殖分化因子cDNA断片をほ乳類細胞系における発現ベクターp d K C R - D H F Rの導入部位である、E c o R I認識部位に導入した。

【0104】動物細胞発現ベクターp d K C R - D H F R (Oikawa, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 164, 39, 1989)はp K C R (O' Hare, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527, 1981)の誘導体でSV 40の初期プロモーター、ラビットβ-グロビン、d h f r (dehydrofolate reductase)遺伝子を有する。尚、この発現ベクターにより形質転換された宿主細胞は、E s c h e r i c h i a c o l i S B M 308と命名されて、工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年6月7日に微工研菌寄第11506号（FERMP-11506）として寄託され、そして1993年2月18日にFERM BP-4197としてブダペスト条約に基く国際寄託に移管された。

【0105】得られた発現ベクターのp d K C R - D H F Rに組み込まれた巨核球増殖分化因子cDNAを含むクローンp d K C R - D H F R - T P O 55についてもT a q D y e D e o x y T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g キット（アプライドバイオシステム社）と蛍光塩基配列決定装置（アプライドバイオシステム社370A型機）を採用し、添付の操作指示書にしたがって決定した。その結果、配列番号：30のヌクレオチド番号99より1236の配列およびオリゴマーNI 078とNI 079の配列と一致した。またベクターに導入された巨核球増殖分化因子cDNAが発現用プロモーターに対して、順方向であることも塩

基配列の決定によって確認した。

【0106】本項の実施例により示されるように、配列番号：30のヌクレオチド配列の情報のみあれば、任意の巨核球増殖分化因子発現細胞（たとえばA431細胞）より、巨核球増殖分化因子cDNAの全て、及び任意の部分を増幅し、塩基配列を決定すること、さらに、任意の発現ベクターにクローン化することは、同業者にとって容易である。

#### 【0107】実施例4. 巨核球増殖分化因子の発現

##### 10 (1) カイコ発現系ベクターの構築

巨核球増殖分化因子cDNAクローンp d K C R - D H F R - T P O 55をNo t Iで消化し、NI 079に人工的に付加してあるNo t I認識部位で切断した。これによって生じたNo t I接着末端を宝酒造（株）のブランディングキットを用い、平滑化し、この平滑末端に、X b a Iリンカー（宝酒造（株））を添付の操作指示書にしたがって導入した。

【0108】このようにして得られたプラスミドをNr u IとX b a Iで同時に消化し、NI 078に人工的に付加してあるNr u I認識部位と、導入したX b a IリンカーのX b a I認識部位とで切断し、Nr u I接着末端とX b a I接着末端を持つ巨核球増殖分化因子cDNA断片を作製した。この断片を、カイコ多角体ウイルス用バキュロウイルス転移ベクターであるp B m 4（蚕糸・昆虫農業技術研究所より入手可能）をNr u IとX b a Iで同時に消化しp B m 4の遺伝子導入部位であるNr u I認識部位に導入し、p B m 4 - T P O 55を得た。

##### 30 【0109】(2) 巨核球増殖分化因子組み換えウイルスの作製

カイコ胚子由来細胞株B o m o 15 A I I c（蚕糸・昆虫農業技術研究所より入手可能）はMGM448に10%ウシ胎児血清（FBS:Gibco BRL）と抗生物質としてゲンタマイシン（500μg/ml）を加えた培地で25℃にて継代培養を行った。巨核球増殖分化因子組み換えウイルスはカイコ多核体ウイルス遺伝子DNAとp B m 4 - T P O 55プラスミドDNAをカイコ培養細胞にたとえばリン酸カルシウム共沈法などで同時に導入することによって作製した。

40 【0110】野生型ウイルスP6E株（蚕糸・昆虫農業技術研究所より入手可能）のゲノムDNA2μgとトランスファープラスミドp B m 4 - T P O 55 10μgを240μlの滅菌精製水に溶解し、等量の0.5M CaCl<sub>2</sub>, 0.1M HEPESを加え混合し10分間室温で放置した後、この混合液に0.2M NaCl, 0.05M HEPES, 0.75mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.75mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を480μl加え、数秒攪拌後、室温で20-30分間放置することにより、ゲノムDNAとプラスミドを含むリン酸カルシウムゲルを形成させた。

【0111】次にこの様にして得られたウイルス遺伝子DNAとトランスファクターを含むリン酸カルシウムゲル混液（サスペンション）960 $\mu$ lを前日に25cm<sup>2</sup>のTフラスコ（T25, Corning）中のMGM448（10%FBS、抗生物質を含む）4mlにまき直したBomol5AIIc細胞へ加え、12時間放置した。新たなMGM448（10%FBS、抗生物質を含む）に培地を交換し25℃にて培養した。培養6日目に培地を回収しウイルス原液とした。

【0112】その培養液を遠心して清澄化した上清を希釈して平面に培養したBomol5AIIc細胞の培養基に添加して8日間培養後、顕微鏡観察によりウイルス感染が見られ、かつ多角体が形成していない培養基を選択した（限界希釈法）。このウイルス液のなかに野生型のウイルスの混入は認められなかった。ここで作製した巨核球増殖分化因子をコードするDNAを含む組み換え体ウイルスをTPO55-BmNPVとした。

#### 【0113】（3）組み換え体ウイルス液の調製

25cm<sup>2</sup>のフラスコ底面で約1 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞のBomol5AIIc細胞を4mlの10%FBSを含むMGM448培地中で2日間平面培養した培養基に前記（2）項でクローニングした組み換え体ウイルスを含むBomol5AIIc細胞の培養液10 $\mu$ lをBomol5AIIc細胞に添加して、25℃で14日間培養後、培養液を1000rpmで5分間遠心分離して、遠心上清を組み換え体ウイルス液として得た。

#### 【0114】（4）組み換え体巨核球増殖分化因子の発現の検証

25cm<sup>2</sup>のフラスコ底面で約1 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞のBomol5AIIc細胞を4mlの10%FBSを含むMGM448培地中で2日間平面培養した培養基に前記で得られた組み換え体ウイルス液あるいは野生型ウイルスを感染多重度0.5になるようにBomol5AIIc細胞に添加して、25℃で3日間培養した。感染細胞及び非感染細胞よりIsogen（和光純薬）をもちいて全RNAを回収した。

【0115】この全RNA 1 $\mu$ gを、アガロース電気泳動に付し、大きさによる分画を行った後、Zetaprobeメンブレン（Bio-Rad）に毛细管現象によって移した。このメンブレンを、digoxigenin（ペーリンガーマンハイム）で標識した巨核球増殖分化因子cDNA（実施例2.1.で得られたN2065とKY100によるPCR産物；配列番号：30のヌクレオチド番号449-1255の配列）（巨核球増殖分化因子プローブDNA）を含むハイブリダイゼーションバッファー中に浸し、42℃で12時間保温することにより、組み換え体巨核球増殖分化因子mRNAと巨核球増殖分化因子プローブDNAの特異的複合体を形成させた。

【0116】この複合体にアルカリホスファターゼを結

合させた抗digoxigenin抗体（ペーリンガーマンハイム）を反応させた後、AMPPD（ペーリンガーマンハイム）のアルカリホスファターゼによる分解時に生ずる化学蛍光発光によって組み換え体巨核球増殖分化因子mRNAを検出した。図11に示すごとく、TPO55-BmNPV感染細胞の全RNAに組み換え体巨核球増殖分化因子mRNAが検出され、この感染細胞内で巨核球増殖分化因子mRNAが発現していることが示された。

#### 10 【0117】（5）カイコ体液の調製

5令のカイコ幼虫に、本項（2）で得た組み換え体ウイルスのウイルス液と比較対照として、野生型ウイルスB6E株を10<sup>3</sup>希釈し50 $\mu$ l/頭注射し、26℃で4～5日間、市販の人工飼育（モース：片倉工業製）を与えて飼育後、50頭のカイコの腹部を切り、体液及び中腸内物などを含む抽出液を氷冷したプラスチックチューブに採取し、遠心分離の上清を得た。

#### 【0118】（6）巨核球増殖分化因子の活性確認

20 本項（5）で得たカイコ体液50mlを20mM Tris/HCl（pH7.4）緩衝液に対して充分透析し、同一緩衝液で平衡化したMatrex BlueAカラム（ $\Phi$ 2.5 $\times$ 15cm）にて分画し組換え体ウイルス、野生型ウイルスを注射したカイコ体液中の活性を比較した。結合蛋白質の溶出は、非結合画分を充分に洗浄後0～1MのNaClの濃度勾配を形成させることにより行った。図12に示すごとく、組換えウイルス液を注射した体液中の巨核球誘導活性は野生型ウイルスを注射した体液由来の活性よりも明らかに高値を示した。

【0119】本明細書に開示された方法は、カイコバキュロウイルス転移ベクターpBm4、カイコ多角体ウイルスP6E株、カイコ細胞Bomol5AIIc細胞に限定されるものではない。例えば、その他のバキュロウイルス転移ベクター（例えばpBK283, pBKblue；以上フナコシ（株）より入手可能）、カイコ多角体ウイルス（精製されたDNAとしてフナコシ（株）より入手可能）、カイコ細胞（BmN4細胞；フナコシ（株）より入手可能）を用いてこれと同等の生理活性物質を得ることは当業者にとって容易である。

#### 【0120】

40 【発明の効果】A431細胞培養上清より新規の巨核球増殖分化因子を精製し、その性質及び部分アミノ酸構造を決定した。今回精製した最終標品はIL-3の存在下で骨髓細胞から巨核球の産生を促進することが認められた。本因子は巨核球の増殖分化過程で重要な調節機能を果たしており、in vivoでも血小板増多因子として働くものである。従って本因子は臨床上大きな問題のある、血小板の減少を伴う各種造血疾患に対してのみならず骨髓移植時の放射線照射によって減少する血小板数のコントロール、がんの化学療法時における血小板数のコントロールなどに対しても有効な治療薬と成りうる。

## 【0121】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列：

Xxx Glu Thr Ile Asn Xxx His Phe Lys

1 5 9

## 【0122】配列番号：2

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

## 配列：

Val Glu Xxx Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Xxx Xxx

1 5 10 15

Asn Ile Asn Lys

19

## 【0124】配列番号：4

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

## 配列：

Xxx Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Xxx Ala Ala

1 5 10 15

Xxx Gly

17

## 【0125】配列番号：5

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列：

Xxx Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys

1 5 9

## 【0126】配列番号：6

## 配列：

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser

1 5 10 15

Arg Met Xxx Gly Lys

20

## 【0127】配列番号：7

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列：

Leu Tyr Asp Ala Lys

1 5

## 【0128】配列番号：8

\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列：

Xxx Gln Xxx Ala Phe Thr Lys

1 5 7

## 【0123】配列番号：3

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：ペプチド

\*

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

★ 配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

30 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

★

☆ 配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列：

Asn Tyr Glu Met Lys

1 5

## 【0129】配列番号：9

☆50 配列の長さ：10

29

30

配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

## 配列：

Ala Val Ala Met Met His Gln Xxx Arg Lys

1

5

10

【0130】配列番号：10

配列の長さ：38

配列：

GTIGARIIIG TIGAYTTYAC IAAVCAYYTI GARGAYAC

【0131】配列番号：11

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列：

TACATCGAIG TIACIGARGA RGGIACNGAR GC

【0132】配列番号：12

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列：

GGCCACGCGT CGACTAGTAC TTTTTTTTTT TTTTTT

【0133】配列番号：13

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

ATGTTGTGGG GACTGCTATA

【0134】配列番号：14

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列：

CAAGGCGAAT GACCTCTAAG TAT

【0135】配列番号：15

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

CCCCGAAGCA ATCCCAGAGA G

【0136】配列番号：16

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

CTCAGGCAGC AGAACGTACA T

【0137】配列番号：17

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

GGCGACGACT CCTGGAGCCC G

【0138】配列番号：18

配列の長さ：22

配列の型：核酸

\* 配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：配列番号3のアミノ酸配列に翻訳対応。I  
はイノシン

\*

※トポロジー：直鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：配列番号4のアミノ酸配列に翻訳対応。I  
はイノシン

※

★トポロジー：直鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：3'-RACE Kit (Gibco BRL) 添付のオリゴマー

★20

☆鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

☆

配列の種類：合成DNA

◆鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

◆30

配列の種類：合成DNA

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

配列の種類：合成DNA

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

40

配列の種類：合成DNA

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

配列の種類：合成DNA

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

50

配列の種類：合成DNA



31

配列:

GACACCAGAC CAACTGGTAA TG

【0139】配列番号: 19

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸

配列:

CATCCGGGAG ATGTACAGCC GGCCGCCAGA GGCAAT

【0140】配列番号: 20

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

配列:

GCTGTGGCCA TGATGCACCA G

【0141】配列番号: 21

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

配列:

TACCTGCGGG CCCTGGGCCT GAAG

【0142】配列番号: 22

配列の長さ: 51

配列の型: 核酸

配列:

CATCCGGGAG ATGTACAGCC GGCCGCCAGA GGCAATGCCA GACAGGTCAG C

【0143】配列番号: 23

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

配列:

GTTTTCCAG TCACGAC

【0144】配列番号: 24

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

配列:

CAGGAAACAG CTATGAC

【0145】配列番号: 25

配列の長さ: 20

配列の特徴: 核酸

配列:

AATTATGGCC CACACCAGTG

【0146】配列番号: 26

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

配列:

ACTAGCCGCT ACAGTCAACA

【0147】配列番号: 27

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

配列:

TTGCCACTTG CCTTTGAAGT A

【0148】配列番号: 28

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

32

22

\* 鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

\* 配列の種類: 合成DNA

36

※ 鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

※10 配列の種類: 合成DNA

21

★ 鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

★ 配列の種類: 合成DNA

24

☆ 鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

☆20 配列の種類: 合成DNA

51

◆ 鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

◆ 配列の種類: 合成DNA

17

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

30 配列の種類: 合成DNA

17

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

配列の種類: 合成DNA

20

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

40 配列の種類: 合成DNA

20

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

配列の種類: 合成DNA

21

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

50 配列の種類: 合成DNA

33

34

配列:

CTGATGCATC ATGGCGACTG C

21

【0149】配列番号: 29

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

\* 鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

\* 配列の種類: 合成DNA

配列:

AGCATTCACC AGCACCATTA C

21

【0150】配列番号: 30

配列の長さ: 1950

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖

※NA)

起源 生物名: ヒト (A431細胞)

10 配列の特徴: ヒト巨核球増殖分化因子をコードするDNA

配列:

配列の種類: complementary DNA (cDNA) ※ 【0151】

GGCAGAGAG GAACTGAAGC CCAGCTGTGA AGGCCGAGA CTGCAGTGAG 50

AGGAGGCTGC ACTCCATTTT GCA ATG GCC TCC CTT GCT GCA GCA AAT 97

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn

1

5

GCA GAG TTT TGC TTC AAC CTG TTC AGA GAG ATG GAT GAC AAT CAA 142

Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln

10

15

20

GGA AAT GGA AAT GTG TTC TTT TCC TCT CTG AGC CTC TTC GCT GCC 187

Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala

25

30

35

CTG GCC CTG GTC CGC TTG GGC GCT CAA GAT GAC TCC CTC TCT CAG 232

Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp Asp Ser Leu Ser Gln

40

45

50

ATT GAT AAG TTG CTT CAT GTT AAC ACT GCC TCA GGA TAT GGA AAC 277

Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser Gly Tyr Gly Asn

55

60

65

TCT TCT AAT AGT CAG TCA GGG CTC CAG TCT CAA CTG AAA AGA GTT 322

Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu Lys Arg Val

70

75

80

TTT TCT GAT ATA AAT GCA TCC CAC AAG GAT TAT GAT CTC AGC ATT 367

Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu Ser Ile

85

90

95

GTG AAT GGG CTT TTT GCT GAA AAA GTG TAT GGC TTT CAT AAG GAC 412

Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys Asp

100

105

110

TAC ATT GAG TGT GCC GAA AAA TTA TAC GAT GCC AAA GTG GAG CGA 457

Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg

115

120

125

GTT GAC TTT ACG AAT CAT TTA GAA GAC ACT AGA CGT AAT ATT AAT 502

Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn

130

135

140

AAG TGG GTT GAA AAT GAA ACA CAT GGC AAA ATC AAG AAC GTG ATT 547

Lys Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile

145

150

155

GGT GAA GGT GGC ATA AGC TCA TCT GCT GTA ATG GTG CTG GTG AAT 592

Gly Glu Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn

160

165

170

35		36
GCT GTG TAC TTC AAA GGC AAG TGG CAA TCA GCC TTC ACC AAG AGC		637
Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser		
175	180	185
GAA ACC ATA AAT TGC CAT TTC AAA TCT CCC AAG TGC TCT GGG AAG		682
Glu Thr Ile Asn Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys		
190	195	200
GCA GTC GCC ATG ATG CAT CAG GAA CGG AAG TTC AAT TTG TCT GTT		727
Ala Val Ala Met Met His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val		
205	210	215
ATT GAG GAC CCA TCA ATG AAG ATT CTT GAG CTC AGA TAC AAT GGT		772
Ile Glu Asp Pro Ser Met Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly		
220	225	230
GGC ATA AAC ATG TAC GTT CTG CTG CCT GAG AAT GAC CTC TCT GAA		817
Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu		
235	240	245
ATT GAA AAC AAA CTG ACC TTT CAG AAT CTA ATG GAA TGG ACC AAT		862
Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn		
250	255	260
CCA AGG CGA ATG ACC TCT AAG TAT GTT GAG GTA TTT TTT CCT CAG		907
Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val Glu Val Phe Phe Pro Gln		
265	270	275
TTC AAG ATA GAG AAG AAT TAT GAA ATG AAA CAA TAT TTG AGA GCC		952
Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys Gln Tyr Leu Arg Ala		
280	285	290
CTA GGG CTG AAA GAT ATC TTT GAT GAA TCC AAA GCA GAT CTC TCT		997
Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys Ala Asp Leu Ser		
295	300	305
GGG ATT GCT TCG GGG GGT CGT CTG TAT ATA TCA AGG ATG ATG CAC		1042
Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg Met Met His		
310	315	320
AAA TCT TAC ATA GAG GTC ACT GAG GAG GGC ACC GAG GCT ACT GCT		1087
Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Thr Ala		
325	330	335
GCC ACA GGA AGT AAT ATT GTA GAA AAG CAA CTC CCT CAG TCC ACG		1132
Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser Thr		
340	345	350
CTG TTT AGA GCT GAC CAC CCA TTC CTA TTT GTT ATC AGG AAG GAT		1177
Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp		
355	360	365
GAC ATC ATC TTA TTC AGT GGC AAA GTT TCT TGC CCT TGA		1216
Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro ...		
370	375	380
AAATCCAATT GGTTTCTGTT ATAGCAGTCC CCACAACATC AAAGAACCAC		1266
CACAAGTCAA TAGATTGAG TTTAATTGGA AAAATGTGGT GTTTCCTTTG		1316
AGTTTATTTT TTCCTAACAT TGGTCAGCAG ATGACACTGG TGA CTG GACC		1366
CTTCCTAGAC ACCTGGTTGA TTGTCCTGAT CCCTGCTCTT AGCATTCTAC		1416
CACCATGTGT CTCACCCATT TCTAATTICA TTGTCTTTCT TCCCACGCTC		1466
ATTTCTATCA TTCTCCCCCA TGACCCGTCT GGAAATTATG GAGAGTGCTC		1516
AACTGGTAAG GAGAACGTAG AAGTAGCCCT AGGGATCCTT TTTGAAACTC		1566
TACAGTTATC GCAGATATTC TAGCTTCATT GTAAGCAATC TAGGAAATAA		1616

37

GCCCTGCTGC TTTCTAGAAA TAAGTGTGAA GGATAAATTT TCTTTGTTGA  
 CCTATGAAGA TTTTAGAGTT TACCTTCATA TGTTTGATTT TAAATCAGTG  
 TATAATCTAG ATGGTAAAAA ATGTGAAATT GGGATTAGGG ACCAACCAAA  
 ATATTTTCATT AATGCTTTCA ATTGACAAAT TTTGGTCTTT CTTTGATAAG  
 ACAATATGTA CATAGTTTTT TCAAATATTA AAGATCTTTT AACTGTTGGC  
 AGTTGTTATC TACAGAATCA TATCTCATAT GCTGTGTAGT TTATAAGTTT  
 TTTCTCTATT TATCAGAATA AAGAAATACA ACAT

38

1666

1716

1766

1816

1866

1916

1950

【0152】配列番号：31

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列：

AACTGAAGCC CAGCTGTGAA

\* トポロジー：直鎖

配列の種類：合成DNA

10 起源 生物名：ヒト

\* 配列の特徴：5' 非翻訳領域

【0153】配列番号：32

配列の長さ：37

配列の型：核酸

配列：

CTCGAATTCG CGATGGCCTC CCTTGCTGCA GCAAATG

※鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

※ 配列の種類：合成DNA

【0154】配列番号：33

配列の長さ：49

配列の型：核酸

配列：

GGGAATTCGC GGCCGCGTGG TGGTCTTTG ATGTTGTGGG GACTGCTAT

37

49

★鎖の数：1本鎖

20 トポロジー：直鎖

★ 配列の種類：合成DNA

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1はQ-セファロースによる分画の過程を示す。溶出はNaCl (0→1.0M) の濃度勾配をフラクション1より120まで形成させることで行った。

黒丸実線；蛋白質の溶出パターン

白丸点線；アセチルコリンエステラーゼ活性

【図2】図2はフェニルセファロースによる分画の過程を示す。溶出は硫酸 (30%→0%)、エチレングリコール (0→50%) の濃度勾配形成をフラクション1より100まで行い、フラクション100から120までは50%エチレングリコールで行った。

黒丸実線；蛋白質の溶出パターン

白丸点線；アセチルコリンエステラーゼ活性

【図3】図3はS-セファロースによる分画の過程を示す。溶出はNaCl (0→0.5M) の濃度勾配をフラクション1より100まで形成させることで行った。

黒丸実線；蛋白質の溶出パターン

白丸点線；アセチルコリンエステラーゼ活性

【図4】図4はハイロード26/60スーパーデックス75による分画の過程および各画分を示す電気泳動図を示す。

上図実線；蛋白質の溶出パターン

白丸実線；アセチルコリンエステラーゼ活性

下図；各画分のSDS-PAGEによる分析結果

【図5】図5は精製した巨核球増殖分化因子のSDS-PAGEによる分析の結果を示す電気泳動図である。

【図6】図6は精製した巨核球増殖分化因子の等電点電 ☆50

☆電気泳動による分析の結果を示す等電点電気泳動図である。

【図7】図7は精製した巨核球増殖分化因子のSDS-PAGE電気泳動による糖鎖分析の結果を示す電気泳動図である。

1. 無処理の巨核球増殖分化因子

2. エンドグリコシダーゼFで処理した巨核球増殖分化因子 (35kDa 付近のバンドは酵素由来のものである)

【図8】図8は、精製した巨核球増殖分化因子 (55kDa 蛋白質) の存在下又は非存在下で、且つIL-3の添加又は無添加のもとでマウス骨髄細胞を5日間培養した場合の巨核球のアセチルコリンエステラーゼ活性を比較したグラフである。

【図9】図9は、精製した巨核球増殖分化因子の存在下 (B) 又は非存在下 (A) で、IL-3の添加後4日間培養したマウス骨髄細胞をアセチルコリンエステラーゼ染色した結果を示し、生物の形態を表わす図面に代る写真である。

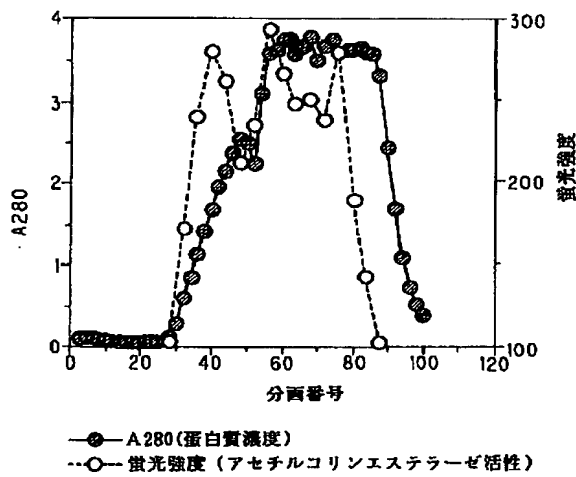
【図10】図10は、精製した巨核球増殖分化因子の存在下 (B) 又は非存在下 (A) で、IL-3の添加後4日間培養したマウス骨髄細胞をメイ=グリンワルド=ギムザ染色した結果を示し、生物の形態を表わす図面に代る写真である。

【図11】図11は、巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子を含む組換え型ウイルス (TPO55-BmNPV) を感染させたカイコ細胞 (レーンB)、野生型ウイルス (B6E) を感染させたカイコ細胞 (レーン

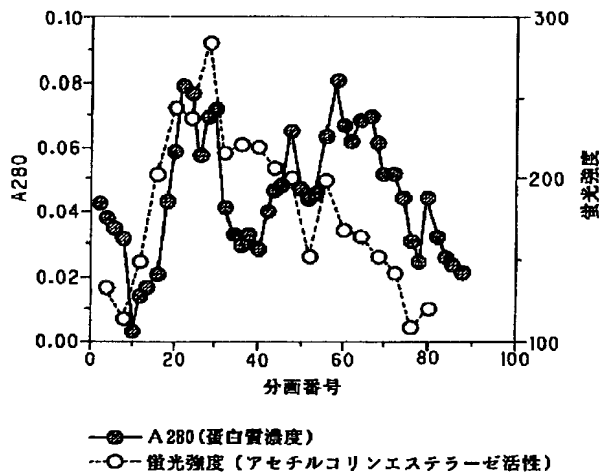
A) 又は未感染細胞 (レーンC) の培養細胞から抽出したRNAを巨核球増殖分化因子cDNAプローブ (配列番号: 30のヌクレオチド番号449-1255) とハイブリダイズさせた結果を示すものであり、図面に代る電気泳動図である。

\*

【図1】



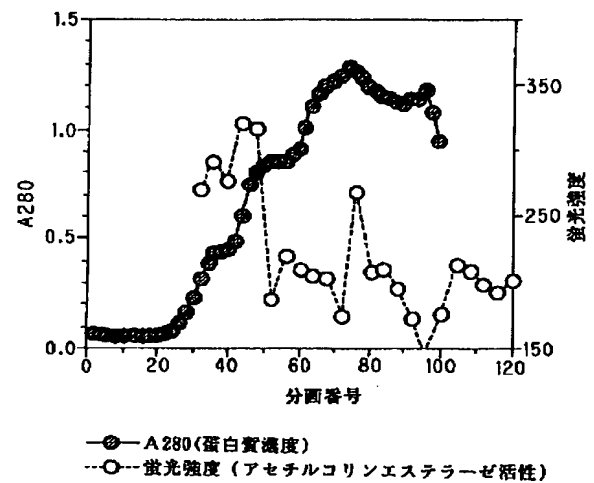
【図3】



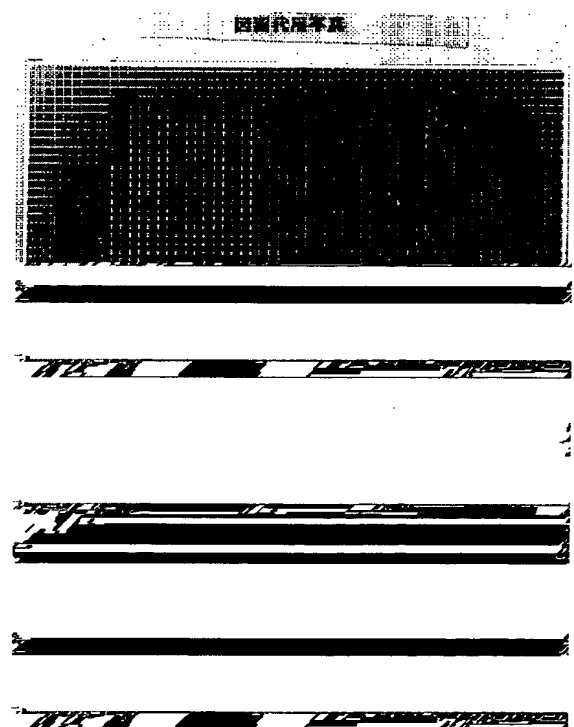
\* 【図12】 図12は、カイコでの巨核球増殖分化因子の発現を示すグラフである。

黒丸; 組換え型ウイルスを感染させたカイコの結果  
白丸; 野生型ウイルスを感染させたカイコの結果。

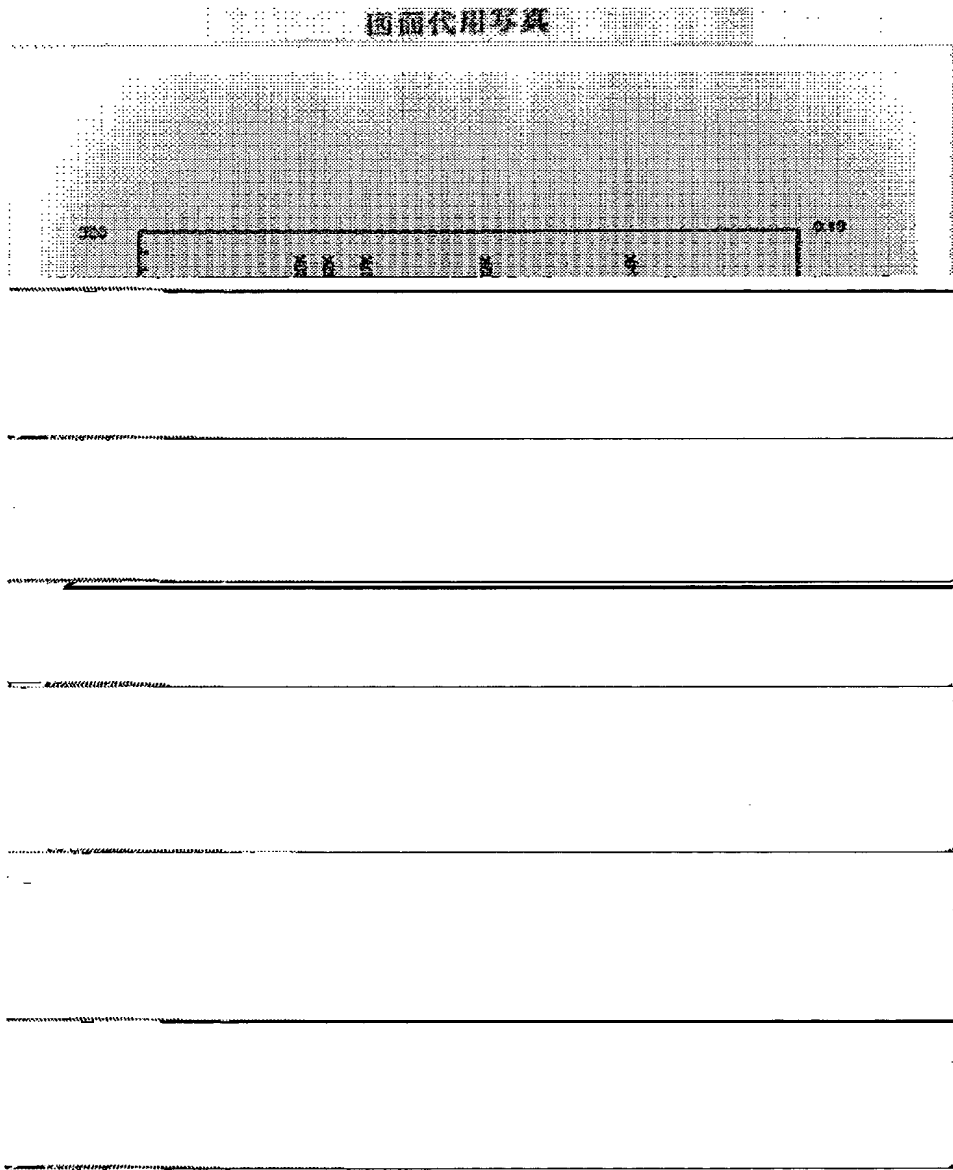
【図2】



【図5】



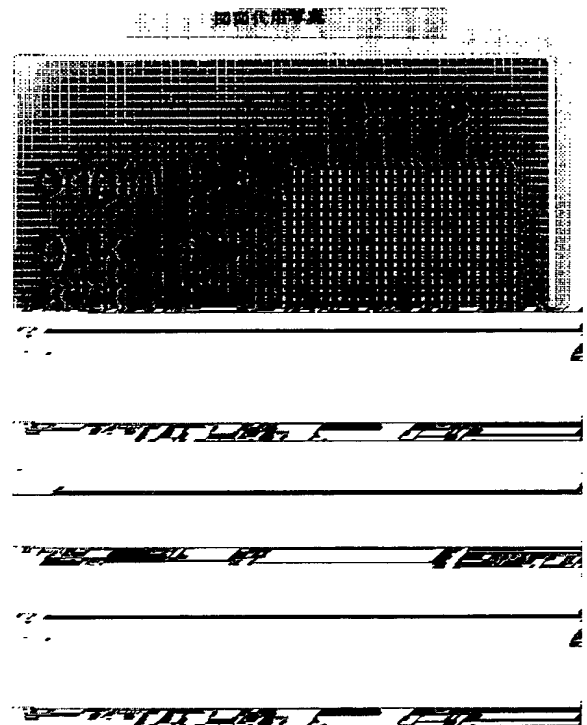
【図4】



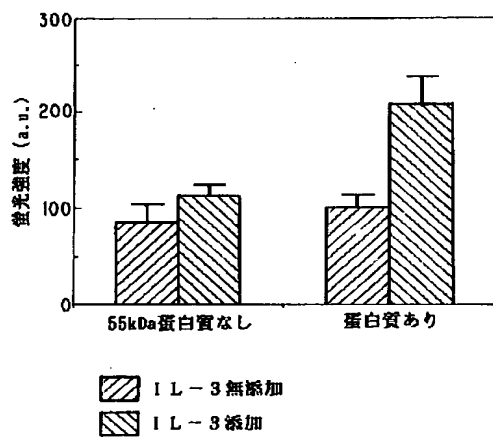
【図6】



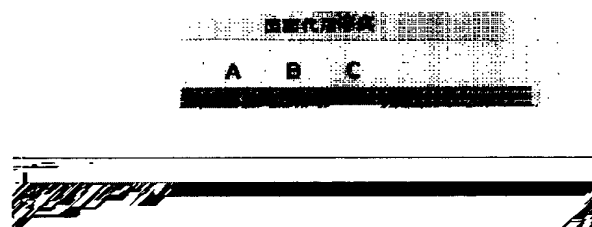
【図7】



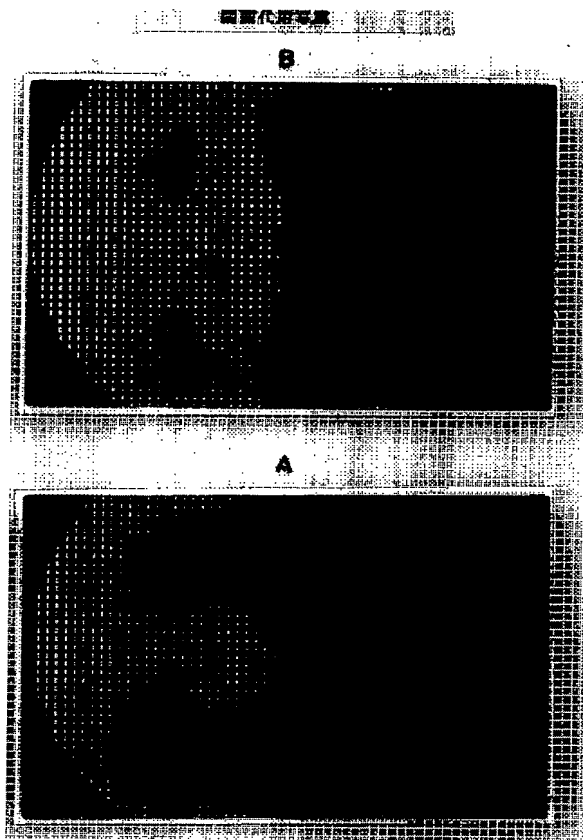
【図8】



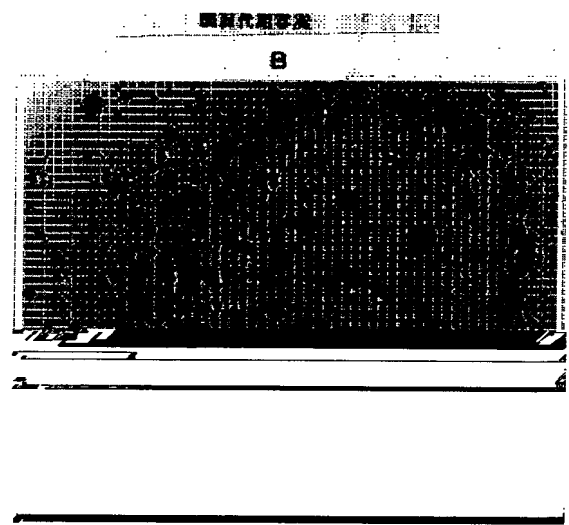
【図11】



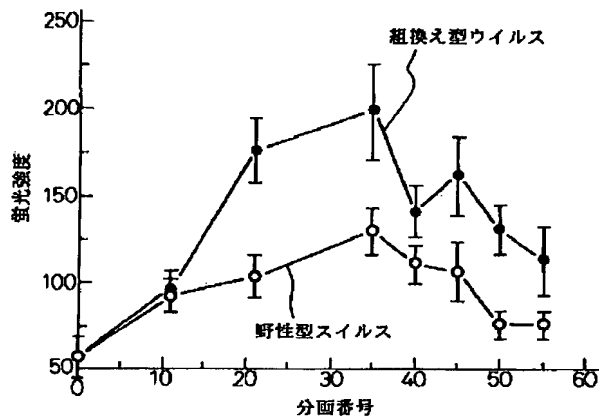
【図9】



【図10】



【図12】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

C 1 2 N 15/19

C 1 2 P 21/02

//(C 1 2 P 21/02

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

H 8214-4B



C12R 1:91)

- (72)発明者 岩佐 冬樹  
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号  
サントリー株式会社生物医学研究所内
- (72)発明者 中里 紘  
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号  
サントリー株式会社生物医学研究所内
- (72)発明者 山市 浩造  
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号  
サントリー株式会社生物医学研究所内

- (72)発明者 三浦 健寿  
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号  
サントリー株式会社生物医学研究所内
- (72)発明者 鶴岡 伸夫  
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号  
サントリー株式会社生物医学研究所内
- (72)発明者 山口 希  
京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル  
新御霊口町285-79

PCT

EP

US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 F2-002PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP98/04269	国際出願日 (日.月.年) 22.09.98	優先日 (日.月.年) 22.09.97	
出願人(氏名又は名称) 宮田 敏男			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 14 は、メサングウム増殖性腎症の検出方法に係る発明であるが、これは実質的に人又は動物における診断方法に係る発明に該当する。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C07K14/47,  
C07K16/18, G01N33/53, A01H67/00, C12P21/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C07K14/47,  
C07K16/18, G01N33/53, A01H67/00, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX ✓	Miyata, T. et al. "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy" J. Clin. Invest. (1998) 第102巻 第4号 p. 828-836	1-13, 15-17
PX ✓	Miyata, T. et al. "Transcriptional Regulation of a Mesangium-Predominant gene, Megsin" J. Am. Soc. Neph. (program and abstr. issue) (1997, Oct.) 第9巻 p. 503A	1-13, 15-17
X ✓	JP, 6-313000, A (サントリー株式会社) 8.11月.1994 (08.11.94) & EP, 583884, A1 & AU, 9341908, A & CA, 2100690, A & HU, 67124, T & AU, 9675387, A & EP, 583884, B1 & DE, 69314574, E & ES, 2108228, T3	1-13, 15-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.12.98

国際調査報告の発送日

22.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 良宏

印

4B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449